

FLUORESCENT PH INDICATOR

Patent number: JP6207112
Publication date: 1994-07-26
Inventor: JIEI BURUUSU PITSUTONAA; RANDARU EI HOOKU
Applicant: BECTON DICKINSON CO
Classification:
 - international: C09B11/28; C09K11/06; G01N21/80; G01N31/22
 - european: C07D311/82; C09B11/24; G01N31/22B
Application number: JP19930173289 19930713
Priority number(s): US19920912426 19920713

Also published as:



EP0582836 (A1)

US5302731 (A1)

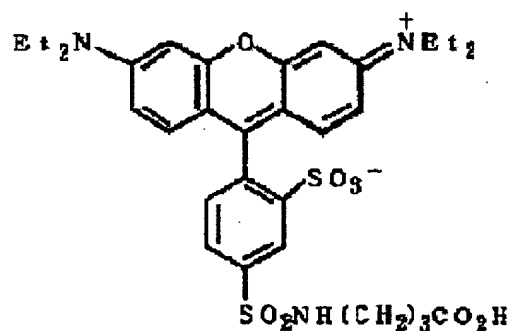
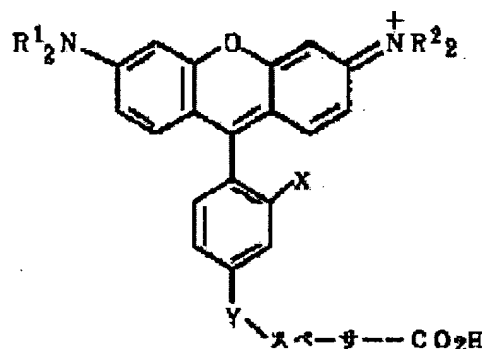
EP0582836 (B1)

Report a data error here

Abstract not available for JP6207112

Abstract of corresponding document: **EP0582836**

Fluorescent pH indicator compounds which exhibit an increase in fluorescence intensity with decreasing pH. The indicators are derivatives of rhodamine and sulforhodamine type dyes and are particularly useful for measuring pH in acidic environments such as carbon dioxide production by microorganisms and pH of certain acidic intracellular compartments.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-207112

(43) 公開日 平成6年(1994)7月26日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 9 B 11/28		C 7306-4H		
		E 7306-4H		
C 0 9 K 11/06		Z 9159-4H		
G 0 1 N 21/80		7906-2 J		
31/22	1 2 3	7132-2 J		

審査請求 有 請求項の数10 O L (全 9 頁)

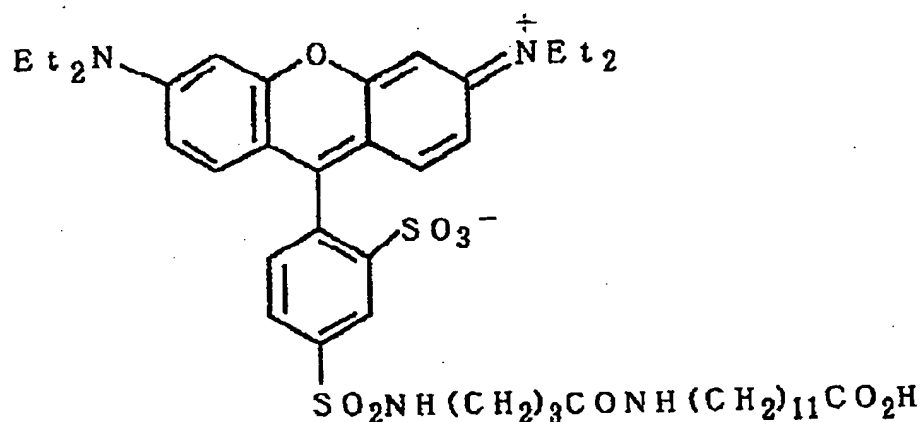
(21) 出願番号	特願平5-173289	(71) 出願人	591007332 ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー BECTON DICKINSON AND COMPANY アメリカ合衆国ニュージャージー州07417-1880, フランクリン・レイクス, ワン・ベクトン・ドライブ (番地なし)
(22) 出願日	平成5年(1993)7月13日	(72) 発明者	ジェイ・ブルース・ビットナー アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27702, ダーラム, ルート 5, ボックス92シー
(31) 優先権主張番号	9 1 2 4 2 6	(74) 代理人	弁理士 湯浅 恭三 (外6名)
(32) 優先日	1992年7月13日		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 蛍光 pH 指示剤

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 測定される環境の酸性度が上昇するにつれて蛍光強度を増す蛍光 pH 指示剤を提供する。

* 【構成】 たとえば右に示される構造式を有する蛍光 pH 指示剤、その製造方法ならびに当該蛍光 pH 指示剤を用いた、媒質の pH 測定方法。



【効果】 本発明の蛍光 pH 指示剤はローダミンおよびスルホローダミン型染料の誘導体であり、pH の低下に伴って蛍光強度の増加を示すものである。本発明の蛍光

pH 指示剤は、酸性環境たとえば微生物による二酸化炭素産生における pH の測定およびある種の細胞内室の pH の測定に有用である。

特開平6-207112

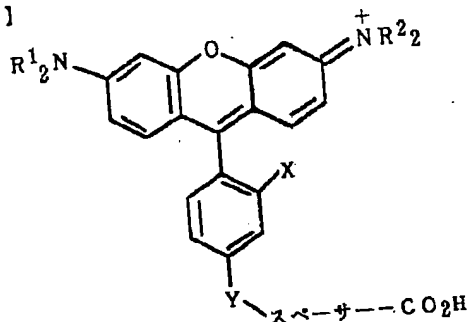
(2)

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式：

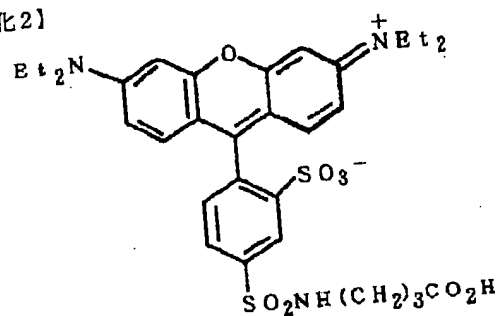
【化1】



(式中、 R^1 および R^2 は水素原子、アルキル基またはシクロアルキル基であり； X は CO_2H (もしくは CO_2^-) または SO_3H (もしくは SO_3^-) であり； Y は $-\text{CONH}-$ または $-\text{SO}_2\text{NH}-$ であり；そして“spacer”は1つ以上の $-(\text{CH}_2)_n-$ ($n=1\sim 12$)、シクロアルキル基または $-\text{CONH}-$ であ*

10

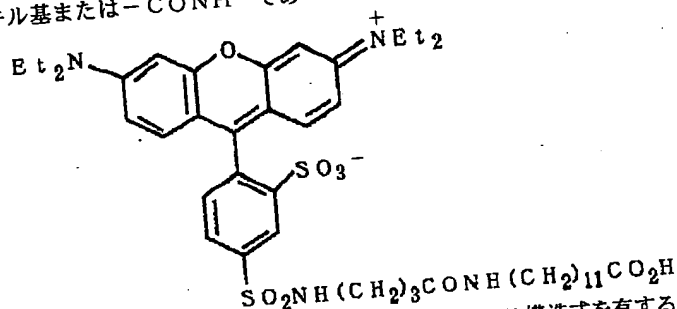
【化2】



で表わされる構造式を有する蛍光pH指示剤。

【請求項4】 次式：

【化3】



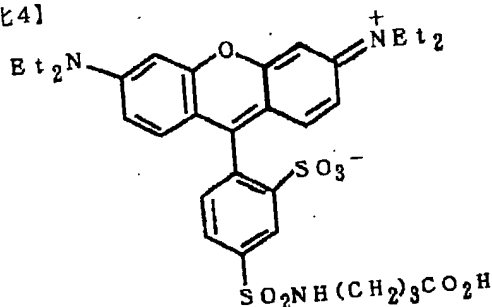
で表わされる構造式を有する蛍光pH指示剤。

【請求項5】 次の工程：

- 請求項1記載の蛍光pH指示剤化合物を媒質に接触させ；
- 上記蛍光化合物を励起するのに適当な波長の光線に上記蛍光化合物を暴露し；
- 励起した上記蛍光化合物により発せられた蛍光の強度を測定し；
- 上記蛍光強度から媒質のpHを測定することからなる媒質のpHの測定方法。

【請求項6】 次式：

【化4】



40

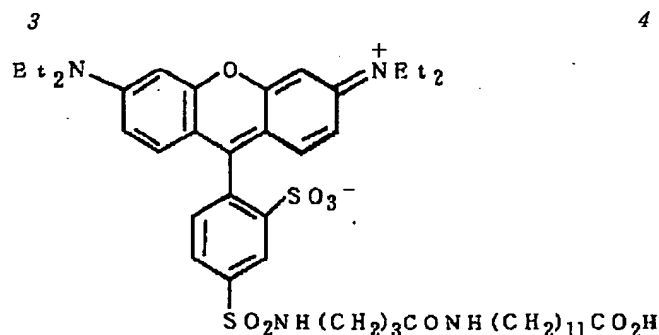
【請求項7】 次式：

【化5】

- 30 以て表わされる構造式を有する化合物を媒質に接触させ、そして該化合物を約544nmの波長光線に暴露する請求項5記載の方法。

(3)

特開平6-207112

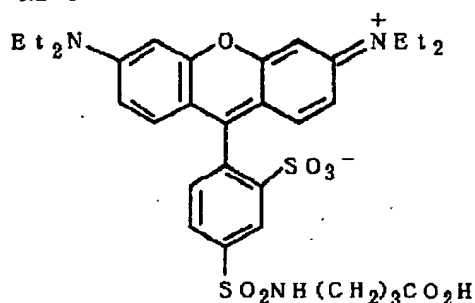


で表わされる化合物を媒質に接触させ、該化合物を約5 10* で表わされる構造式を有する化合物を合成する方法であ
44 nmの波長光線に暴露する請求項5記載の方法。

【請求項8】 細胞内媒質のpHを測定する請求項5、
6または7記載の方法。

【請求項9】 次式：

【化6】



20

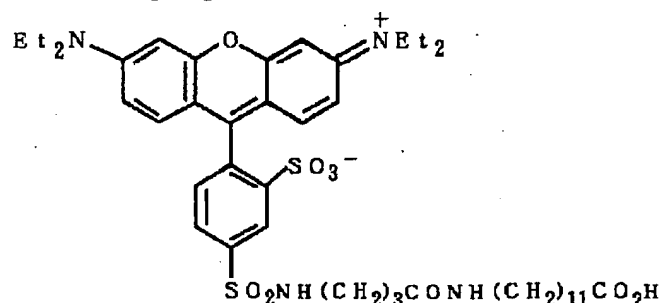
って、次の工程：

(a) ジメチルアミノピリジンおよびトリエチルアミン
の存在下にスルホローダミンBスルホニルクロリドをγ
-アミノ酪酸と反応させ；

(b) 工程(a)からの反応生成物を単離し；そして
(c) 上記反応生成物から上記化合物を回収することか
らなる前記方法。

【請求項10】 次式：

【化7】



で表わされる構造式を有する化合物を合成する方法であ
って、次の工程：

(a) 塩化メチレンおよびジシクロヘキシルカルボジイ
ミドの存在下に請求項9記載の方法により作られる化
合物をN-ヒドロキシサクシニミドと反応させ；

(b) 工程(a)からの反応生成物を単離し；そして

(c) 上記反応生成物から上記構造式を有する化合物を
回収することからなる前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、蛍光pH指示剤に関
し、特に測定される環境の酸性度が上昇するにつれて蛍
光強度を増す蛍光pH指示剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 溶液、細胞および組織のpH測定は生物
学および化学的研究の多くの分野で重要であり、様々
な電気的および分光光学的技術がこのような測定を行な

うために開発されてきた。吸収指示染料たとえばフェノ
ールフタレインを用いた光学的指示剤によるpHの測定
は長年の間これらの分野に一般的に使用されており、測
定は視覚的または器械を用いて行なわれていた。しかし
ながら、吸光度よりむしろ蛍光によるpHの測定の方が
感度が良いという利点を有する。なぜなら吸収光より発
光の方がより簡単に検出されるからである。pH指示剤
として蛍光染料を用いると、最少量の染料を用いてフロ
ーサイトメトリ法により一つの細胞の細胞内pHを測
定することができる。

【0003】 pHの測定に有用な多くの蛍光染料が当該
技術で公知である。有用な蛍光pH指示剤に対する主な
考察点は、化合物の蛍光強度が測定される基質のpHと
できるだけ確実に相関関係を結ぶことである。pH0～
14の範囲にわたって容易に入手可能な蛍光pH指示剤
の広範囲に及ぶリストは、ギルボウル(G. G. Guil
lbault)、“プラクティカル フルオレセンス

(4)

特開平6-207112

5

(Practical Fluorescence) " (1973) に開示されている。

【0004】当該技術で公知の蛍光pH指示剤の多くは、通常は蛍光強度の増加を伴ないながら、塩基性溶液中でより長波長へ吸収をシフトさせるフェノール誘導体である。これらはフェノール型官能性の脱プロトン化を当てにして蛍光強度を高めるため、これらはより長い蛍光波長で酸性度が上昇すると蛍光強度の低下を示す。フルオレセインおよびウムベリフェロンはこの種の指示剤の例である (ホウランド (R. P. Haugland) 10
1989, "モレキュラー プローブズ ハンドブック (Molecular Probes Handbook)" モレキュラー プローブズ社 (Molecular Probes, Inc.), ユージン (Eugene), オレゴン, p. 30, 図4. 2および4. 3)。酸性度が上がると蛍光の増加を示す蛍光pH指示剤はほとんど知られておらず、たとえばエンドソームおよびリソソームのような比較的酸性環境における蛍光pH指示剤の利用を制限する。

【0005】セミナフトローダフルオール (SNARF) およびセミナフトフルオレセイン (SNAFL) pH指示剤は最近開発されたもので、約6. 3~8. 6の範囲におけるpH変化を測定するために有用でありそして細胞内pHの測定に適するものである。これらはベンゾ [c] キサンテン誘導体でありほとんどの他の蛍光pH指示剤と比較していくらか長波長の指示剤であり、これにより488または514nmのアルゴンレーザーにより励起しながらフローサイトメトリー法での使用に適するようになる。しかしながら、SNARF-6およびSNAFL-1を除いて、この系列の指示剤は酸性度が上がるとうと蛍光強度が低下するというpHに対する通常の反応を示す。SNARF-6およびSNAFL-1は短かい波長でのみ酸性度が上がると蛍光強度の増加を示し、したがって検出をより複雑で高価な器械操作に制限する。これらのpH指示剤は米国特許第4, 945, 171号および"モレキュラ プローブズ ハンドブック" (ホウランド, 1989, 前掲, p 86~88および93; それぞれ化合物C-1277およびC-1255) に記載されている。対照的に、本発明の染料はpHが低下すると蛍光が増加する蛍光スペクトルを示すが、しかしこれはより長波長で最大蛍光が生じる (すなわち、等吸収点の右側に対して)。本発明の操作の仕方についてのいずれの特定理論に縛られることを望むものではないが、出願人は前述の特性により本発明の化合物がpH依存性蛍光に関してSNARF-6およびSNAFL-1とは異なる化学的メカニズムを有することを示唆していると信じている。

【0006】2', 7'-ビス (2-カルボキシエチル) -5- (および-6) カルボキシフルオレセイン (BCECF) は、カルボン酸に接続する2つの一炭素 50

6

スパーサーからなるフルオレセイン部分 (molety) と連結する側鎖基を有するpH感受性染料である。ホウランド, 1989, 前掲, p. 88および93、化合物B-1151。側鎖基は本発明の化合物のものと類似しているが、しかしながらフルオレセイン部分は本発明の化合物のローダミンおよびスルホローダミン部分と構造的にかなり異なる。その上、BCECFがフルオレセインの誘導体であるので、そのpH依存性蛍光強度はフルオレセインの特性であり、すなわち酸性度の上昇に伴ない蛍光強度が低下する (グラバー (Grabner) 10
ら, 1986, Anal-Biochem. 156, 202-212)。BCECFは、これがBCECFそれ自体の場合に比較して、細胞に簡単に吸収されそして保持されやすいBCECFアセトキシメチル エステル/モノアセテート (BCECF-AM) として合成されるので細胞内pHを指示するために特に有用である (コルバー (Kolber) 10
ら, 1988, J. Immunol. Mtds. 108, 255-264)。細胞の内側でBCECF-AMは細胞エステラーゼにより加水分解されて酸の形態を形成し、これがpH依存性蛍光反応を示す。

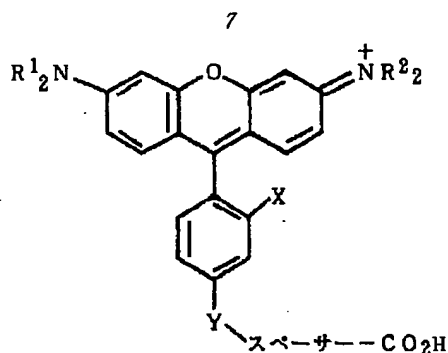
【0007】

【発明が解決しようとする課題】ローダミンおよびスルホローダミン型蛍光染料はまた当該技術で公知であり、たとえばローダミンB、スルホローダミンB、ローダミン6G、スルホローダミンGおよびテキサス レッド (Texas Red) が含まれる。これらの染料は蛍光研究に広範囲に使用されるが、しかしこれらはもしあったとしてもわずかなpH依存性蛍光強度を示すだけである。本発明の化合物はローダミンまたはスルホローダミンの誘導体であるので、これら化合物のpH感受性は親化合物がpHに依存しない蛍光を示すという事実のため期待されなかった。それゆえ本発明の化合物はスルホローダミン群の最初に知られたpH感受性染料である。フルオレセイン (フェノール性) およびローダミン (アナリン様) 染料との混成物 (hybrid) であるSNARF群の染料に例外があるかもしれないが、本発明のもの以外のローダミンを基礎とするpH感受性染料は知られていない。さらに、本発明の化合物は初めて蛍光長波長にて酸性度が上昇するにつれて蛍光強度も増加するpH指示剤を提供するものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明の蛍光pH指示剤は以下の構造式を有するローダミンまたはスルホローダミンの誘導体である:

【化8】



(式中、R¹ および R² は水素原子、アルキル基またはシクロアルキル基であり；XはCO₂H（もしくはCO₂⁻）またはSO₃H（もしくはSO₃⁻）であり；Yは—CONH—または—SO₂NH—であり；“スペーサー”は1つ以上の—(CH₂)_n—（n=1～12）、シクロアルキル基または—CONH—である。）
従来技術の蛍光 pH 指示染料と違い、これらの化合物はより長波長の発光で水溶液中 pH 7～10 の範囲で pH を低下させると蛍光強度の増加を示す。すなわち、これらの化合物はローダミン染料の幾つかの利点（すなわち、高収率、長い励起波長および光安定性）を有するが、しかし従来技術のローダミン型染料中に存在しない蛍光強度における pH 依存性変化をも示す。より長い波長の特性により実施者がより安価な器械を使用して蛍光を検出することができるようになり、そして酸性条件下での蛍光応答の増加により、これまで公知の蛍光 pH 指示剤では満足できなかった多くの生物学的用途、たとえば細菌性 CO₂ 産生の測定において高感度を提供する。

【0009】図1は化合物 I（SRB-GABA）の pH 依存性蛍光反応を示す。

【0010】図2は化合物 II（SRB-GABA-A

(5)

特開平6-207112

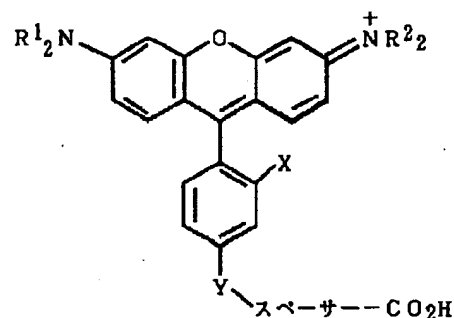
8

DA) の pH 依存性蛍光反応を示す。

【0011】本発明の蛍光 pH 指示剤は、“スペーサー”により染料へ連結したカルボン酸を有するローダミンまたはスルホローダミンの蛍光染料の誘導体である。

これらは次の一般的構造を有する：

【化9】



(式中、R¹ および R² は水素原子、アルキル基またはシクロアルキル基であり；XはCO₂H（もしくはCO₂⁻）またはSO₃H（もしくはSO₃⁻）であり；Yは—CONH—または—SO₂NH—であり；そしてスペーサーは1つ以上の—(CH₂)_n—（n=1～12）、シクロアルキル基または—CONH—である。）
好ましい化合物は、式中 R¹ および R² が水素原子、アルキル基またはシクロアルキル基であり；XがSO₃H（もしくはSO₃⁻）であり；Yが—SO₂NH—であり；そしてスペーサーが1つ以上の—(CH₂)_n—（n=1～12）、シクロアルキル基または—CONH—であるスルホローダミンの誘導体である。

【0012】最も好ましい化合物は次の構造式を有する：

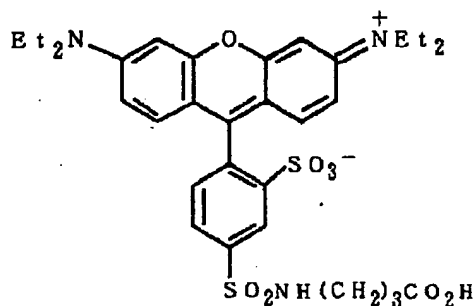
【化10】

(6)

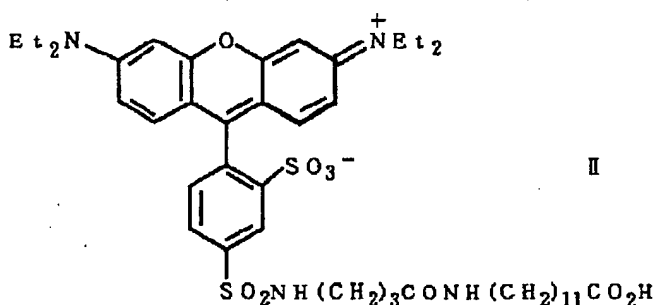
特開平6-207112

9

10



または



(式中、Etがエチル基である)。化合物IおよびIIはスルホローダミンBの誘導体である。化合物Iにおいて、Y-スパーサー-CO₂H部分はスルホローダミンBのパラ位でスルホニル基と連結したγ-アミノ酪酸(GABA)である。化合物IIにおいて、Y-スパーサー-CO₂H部分はスルホニル基と連結したGABAおよび12-アミノドデカン酸(ADA)である。

【0013】これらのpH指示剤は約pH7~約pH10のpH検出範囲を有する。最善には、これらは約544nmで励起されそして発光が約580~590nmで測定される。この励起波長により励起のためにヘリウム-ネオン(HeNe)レーザーを使用することができしかも天然蛍光のためにコスト的利点とバックグラウンドの排除を伴う。HeNeレーザーは免疫蛍光およびフローサイトメトリー用途ならびに二酸化炭素感知装置にも一般に使用され、これにより本発明のpH指示剤は特にこれらのタイプの研究に使用するのに適するものとなる。

【0014】本発明の化合物はローダミンまたはスルホローダミン酸塩化合物をスパーサー部分と反応させることにより合成される。化合物Iの場合、スルホローダミンBスルホニルクロリドをGABAと反応させてpH指示剤(SRB-GABA)を形成する。化合物IIについては、SRB-GABAを次いでN-ヒドロキシサクシニミド(NHS)と反応させて活性化エステルを形成しこれをADAと結合する。同様にしてSRB-GABA-NHSとペンタグリシンとを反応させることによりペンタグリシン誘導体が製造されると思われる。

【0015】本発明を説明するために本発明の特定の

施態様を以下の実施例に記載する。これらはいずれにしても特許請求の範囲で定義される本発明の範囲を限定するものではない。本明細書および以下の実施例を研究する際、本発明の修正および変形が本発明の精神を外れることなくそして本発明技術を実習することなく当業者に思い出されるであろう。これらの修正および変形もまた本発明に含まれる。

【0016】以下の実験的実施例において、分析用TLCは、EMサイエンス社(ニュージャージー州、チェリーヒル、カタログ番号5534)からの0.25mm厚アルミニウム裏打ちシリカゲル板および0.2mm厚ワットマンガラス裏打ち逆相KC-18F板において行なわれた。分析用逆相HPLCは光ダイオード配列検知(200~600nm)を備えたウォーターズ860I Iポンプ装置およびブラウンリー(Brownlee)スフェリー(Spheri)-5 RP-18220×4.6mmカラムを使用した。1:1~95:5のメタノール:水の直線状勾配液を30分間かけてHPLCに使用した。蛍光スペクトルをパーキン-エルマーLS-5フルオロメーターに記録した。NMRスペクトルをIBM/ブルッカーWP-200SY200MHz装置に記録し、化学シフトをテトラメチルシランとの関係で報告する。陽イオン高速原子衝撃(FAB+)質量スペクトルを、グリセロールマトリックスを用いたVGトリオー2四重極装置を用いて得た。スルホローダミンB(SRB)はポリサイエンス社(ペンシルバニア州、ウォーリントン)から入手し、そして上記条件下でHPLC保持時間は2.0分であった。

【0017】

(7)

特開平6-207112

11

12

【実施例】

実施例1 SRB-GABAの合成

スルホローダミンB スルホニルクロリド (0.740 g, 1.28ミリモル) およびγ-アミノ酪酸 (GABA, 1.32 g, 12.8ミリモル) を、0℃に維持した水中にジメチルアミノピリジン (DMAP- アルドリッヒ, 30mg) および30%トリエチルアミン (Et3N-フィッシャー) を混合した攪拌混液へ添加した。攪拌を0℃にて4時間、次いで室温にて一晩続けた。溶媒を回転蒸発により除くと、その結果黒紫/ピンク色の残渣が得られた。メタノール数滴と続いてCH₂Cl₂ 2.5mlを残渣へ加えた。混合物を攪拌し、不溶性分画を減圧濾過により分離し、CH₂Cl₂ で2回洗浄した。濾液を濃縮しクロマトグラフにかけた (フラッシュシリカ, 1:9:90~2:16:80の酢酸:メタノール:CH₂Cl₂ 勾配液)。カラム分画をTLC (シリカ, 1:9:90の酢酸:メタノール:CH₂Cl₂) で分析し、中間で溶出するピンク色の帯を含む最も純粋な分画を集めた。NMR分析で幾つかの分画にGABAによる汚染の可能性が示されたのでこれらをCH₂Cl₂ 中の懸濁液から再度濾過し、全部でSRB-GABA 89mgが得られた。収率11%はたぶん濾過工程における生成物の損失のためであろう。

【0018】生成物の分析

¹H NMR (4:1 CDCl₃: -CD₃OD) w 1.33 (t, 12H), 1.73 (t, 2H), 2.28 (t, 2H), 2.93 (t, 2H), 3.62 (q, 8H), 6.70-7.35 (スルホローダミンH'S), 8.29 (d, 1H), 8.65 (s, 1H)。

【0019】¹³C NMR (4:1 CDCl₃: -CD₃OD) w 12.2, 24.7, 30.8, 42.2, 45.8, 95.8, 114.0, 126.0, 129.6, 130.7, 131.4, 131.9, 140.6, 155.6, 156.0, 157.6。

【0020】HPLC 保持時間 11.4分

高分解能 FAB+MS [MH⁺]: C₃₁H₃₈N₃O₈S₂

計算値 644.2100 実測値 644.2076

実施例2 SRB-GABAのpH反応

実施例1で合成されたSRB-GABAは、スルホローダミンからのその誘導化のためにpHに対し蛍光的に安定であることが最初は予想された。しかしながら、この化合物のpH対UV/可視光スペクトルの分析により、SRBに存在しなかったいくつかのpH依存性挙動が示された。実施例1で合成されたSRB-GABAのpH対蛍光強度特性を測定するために、化合物を10mMリン酸塩緩衝液、pH8.0中に溶かした。これを綿に通して濾過し散乱を減らし、pHを必要に応じて希 (約

0.1N) 水酸化ナトリウムと塩酸溶液で調節した。

【0021】パーキンエルマー (Perkin Elmer) LS-5 蛍光光度計を次のようにセットした:

スリット: 励起=5; 発光=3

スピード: 120nm/分

励起: 544nm

発光: 500~700nm

驚くべきことに、SRB-GABA化合物 (化合物I)

は、pHの変化に対応して蛍光強度が変化し、そしてpHがより酸性になるにしたがって蛍光強度が増えることを示した。結果を表Iに示す。

【0022】

【表1】

表 I

pH	蛍光強度
11.30	63
10.15	64
9.35	103
8.90	147
8.40	193
8.00	253
7.75	260
7.40	270

上記結果を図1にグラフで示す。SRB-GABAは約8~9.5のpH範囲で最大のpH対蛍光強度変化を示し、pH7.4~10.15の蛍光強度においてはほぼ4倍に変化する。この研究の結果を図1にグラフで示す。

【0023】実施例3 SRB-GABA-ADAの合成

SRB-GABA NHSエステルを、ボダンスキーアンド ボダンスキー (Bodansky and Bodansky), "ザ プラクティスオブ ペプチド シンセシス (The Practice of Peptide Synthesis)", 1984, p125に記載されたものとはほぼ同じに調製した。SRB-GABA (140mg, 0.218ミリモル) およびN-ヒドロキシ-サクシニミド (30mg, 0.26ミリモル) を、無水CH₂Cl₂ 5ml含有丸底フラスコへ加えた。攪拌混合物をアルゴン下に氷浴中で冷却した。ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC, 54mg, 0.26ミリモル) を加え、混合物をアルゴン下に周囲温度にて18時間攪拌した。得られた混合物を粗ガラスフリットに通して濾過し、固体をCH₂Cl₂ で2回リンスした。集めた濾液から溶媒を除去し、分画を洗浄し、残渣をクロマトグラフィにかけた (フラッシュシリカ, 1:9のメタノール:CH₂Cl₂)。所望のNHSエステルは少量の未反応SRB-GABAのちょうど前において溶出した。溶媒を減圧下に除去すると、SRB-GABA NHSエステル138mg (85%) がピンク/紫色の "ガラス" として得られた。

(8)

特開平6-207112

13

【0024】生成物分析： ^1H NMR (CDCl_3 / CD_3OD) δ 1.28 (t, 12H), 1.85 (t, 2H), 2.63 (t, 2H), 2.71 (br s, 1H), 2.97 (t, 2H), 3.30 (br s, 4H, サクシニミド- (CH_2) $_2$ -), 3.65 (q, 8H), 6.70-7.18 (m, 7H), 8.23-8.55 (m, 2H); FAB+MS: m/z 741 (MH $^+$), 713 (M $^+$ - Et), 626 (M $^+$ - NHS)

高分解能 FAB+MS (MH $^+$): $\text{C}_{38}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{S}_2\text{O}_{10}$

計算値 741.2264 実測値 741.2260

SRB-GABA-NHSエステル (138mg, 0.186ミリモル) および12-アミノドデカン酸 (ADA-アルドリッヒ, 60mg, 0.28ミリモル) を、5ml CH_2Cl_2 含有丸底フラスコへ加え、混合物を周囲温度にてアルゴン下に72時間攪拌した。TLC分析 (シリカ、10%メタノール- CH_2Cl_2) によれば、未反応NHSエステル ($R_f=0.35$) とともに新規生成物 ($R_f=0.28$) が示された。さらにADAまたはDMAPを添加しても反応が完了したことは観察されなかった。溶媒蒸発に続いてフラッシュクロマトグラフィ (シリカ、7%~12% メタノール- CH_2Cl_2 の勾配溶液) を行なうとNHSエステル24mgと、ピンク/紫色の“ガラス”として完全に純粋なSRB-GABA-ADA 64mg (41%) が得

14

られた。これを同じ条件下に再度クロマトグラフィにかけると分析のための純粋な物質が得られた。

【0025】生成物分析： ^1H NMR (CDCl_3 / CD_3OD) δ 1.25 (br s, 16H), 1.28 (t, 12H), 1.58 (t, 2H), 1.65 (t, 2H), 2.20 (t, 2H), 2.28 (t, 2H), 2.95 (t, 2H), 3.08 (t, 2H), 3.65 (q, 8H), 6.70-7.18 (m, 7H), 8.23-8.55 (m, 2H)

HPLC 保持時間 26.5分

高分解能 FAB+MS (MH $^+$): $\text{C}_{43}\text{H}_{61}\text{N}_4\text{S}_2\text{O}_9$

計算値 841.3880, 実測値 841.3869

実施例4 SRB-GABA-ADAのpH反応

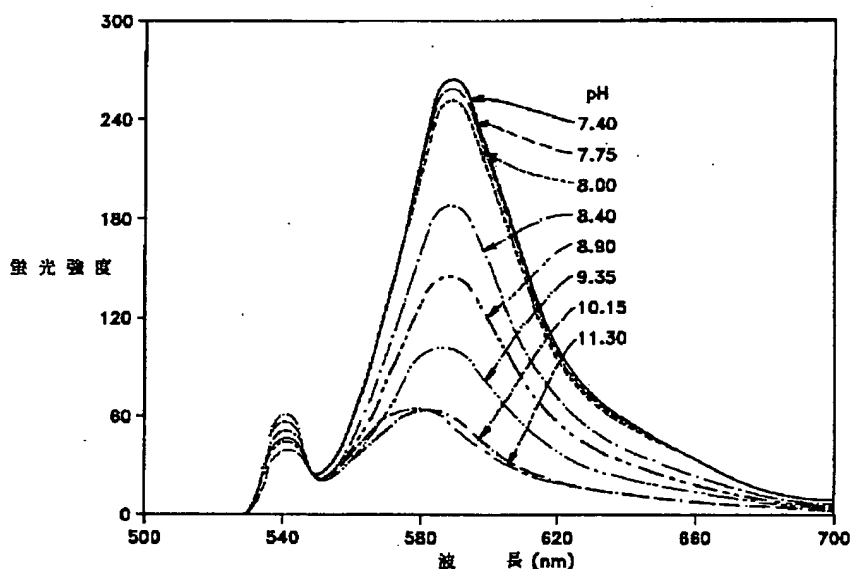
実施例3で合成されたSRB-GABA-ADA化合物のpH反応特性を、SRB-GABAに対し実施例2で記載したのとはほぼ同じように評価した。蛍光強度をpH 11.2、9.5、8.9および8.1で測定し、結果を図2にグラフで示した。ここでも蛍光強度における最大の変化が約pH 8~pH 9.5の間で見られ、pH 8.1~11.2の蛍光強度で約6倍の変化であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、化合物I (SRB-GABA) のpH依存性蛍光反応を示すグラフである。

【図2】図2は、化合物II (SRB-GABA-ADA) のpH依存性蛍光反応を示すグラフである。

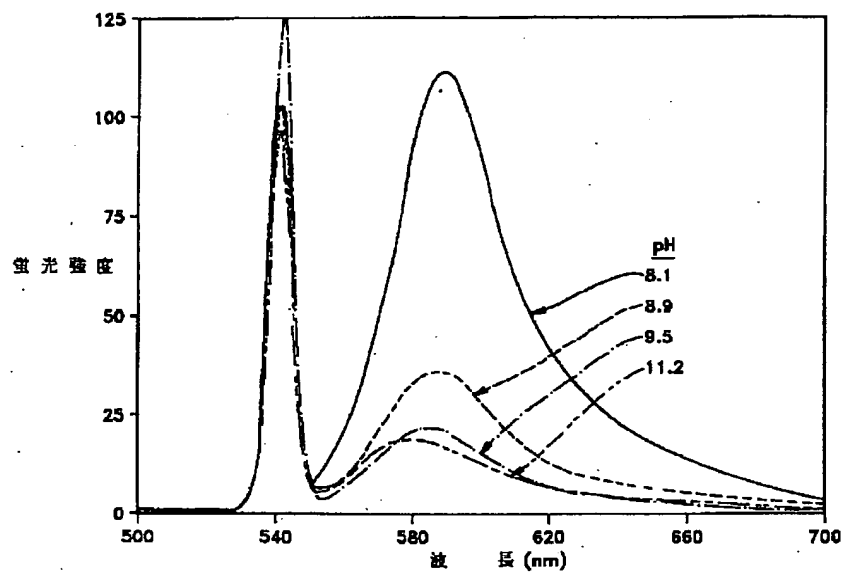
【図1】



(9)

特開平6-207112

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 ランダル・エイ・ホーク
アメリカ合衆国ノース・カロライナ州
27513, ケアリー, スティール・トラッ
プ・コート 107